

Electro-elution of charged cpds. bonded to sepn. gel - in appts. comprising two electrode chambers connected by gel receiving containers, for recovering nucleic acid, proteins, etc

Patent number: DE3913814
Publication date: 1990-07-19
Inventor: BAUER GUENTHER [DE]; LINDEMANN BJOERN [DE]
Applicant: MAX PLANCK GESELLSCHAFT [DE]
Classification:
- international: B01D57/02; B01J47/06; C07H21/02; C07H21/04; C07K15/00; G01N27/28
- european: B01D57/02; C07K1/26; G01N27/447B3B
Application number: DE19893913814 19890426
Priority number(s): DE19893913814 19890426; DE19893900920 19890113

Abstract of DE3913814

Appts. for electrical elution of electrically-charged substances (I) bound to a sepn. gel comprises at least one electrode chamber for each of a cathode and an anode, these chambers being joined (as the only electrical connection between them) by a receiving container for the gel and, attached to it, a collecting container which contains a sorbent to which eluted (I) bind. The sorbent is an ion-exchanger (particularly a DEAE material) or a reverse-phase material. The two containers are sepd. from each other and/or from the electrode chambers by a filter and/or frit. **USE/ADVANTAGE** - This appts. provides high recovery of (I) such as RNA, DNA, proteins and polypeptides. It is simple enough to be disposable (preventing cross-contamination and facilitating use with radioactive samples) and is suitable for large-scale operations.

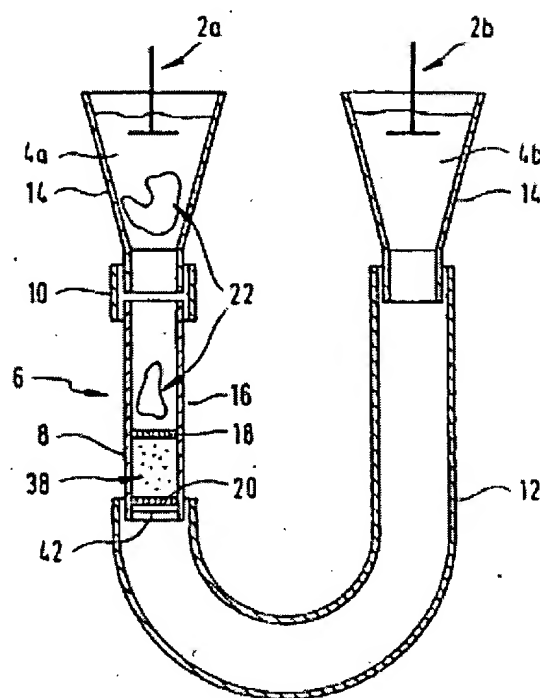


FIG. 1

Data supplied from the esp@cenet database - Worldwide

19 BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENTAMT

12 Offenlegungsschrift
11 DE 39 13 814 A 1

21 Aktenzeichen: P 39 13 814.3
22 Anmeldetag: 26. 4. 89
43 Offenlegungstag: 19. 7. 90

51 Int. Cl. 5:
B 01 D 57/02
B 01 J 47/08
G 01 N 27/28
C 07 H 21/02
C 07 H 21/04
C 07 K 15/00
// B 01 J 20/22,
C 07 K 13/00, 5/00, 7/00

DE 3913814 A 1

30 Innere Priorität: 32 33 31
13.01.89 DE 39 00 920.3

71 Anmelder:
Max-Planck-Gesellschaft zur Förderung der
Wissenschaften eV, 3400 Göttingen, DE

74 Vertreter:
Weickmann, H., Dipl.-Ing.; Fincke, K., Dipl.-Phys.
Dr.; Weickmann, F., Dipl.-Ing.; Huber, B.,
Dipl.-Chem.; Liska, H., Dipl.-Ing. Dr.-Ing.; Prechtel,
J., Dipl.-Phys. Dr.rer.nat., Pat.-Anwälte, 8000
München

72 Erfinder:
Bauer, Günther, 3429 Krebeck, DE; Lindemann,
Björn, 3400 Göttingen, DE

54 Verfahren zur elektrischen Elution von auf Trenngelen gebundenen, elektrisch geladenen Substanzen und eine Anordnung zur Durchführung des Verfahrens

Zur elektrischen Elution von auf Trenngelen (22) gebundenen, elektrisch geladenen Substanzen dient eine Anordnung, umfassend mindestens jeweils einen Elektrodenraum (4a, 4b) für Kathode und Anode, wobei die Elektrodenräume (4a, 4b) über mindestens ein Aufnahmebehältnis (6) für das zu eluierende Trenngel (22) und über mindestens ein sich daran anschließendes Sammelbehältnis (8) als einzige elektrisch leitende Verbindung miteinander verbunden sind und wobei das Sammelbehältnis (8) ein Sorbens (38) wie z. B. einen Ionenaustauscher oder ein Reversed Phase-Material enthält, an das die zu eluierende Substanz bindet. Die Elution wird durchgeführt, indem man

- das die Substanzen enthaltende Trenngel (22) in ein zwischen zwei Elektroden (2a, 2b) angebrachtes, einen Elektro-Elutions-Puffer enthaltendes Aufnahmebehältnis (6) bringt, und
- durch Anlegen eines elektrischen Feldes die Substanz von dem Trenngel (22) heraus in den Elektro-Elutions-Puffer und von dort
- in ein Sammelbehältnis (8) wandern läßt, welches ein Sorbens (38) enthält,
- die Substanz an das Sorbens (38) bindet und anschließend
- die vom Sorbens (38) gebundene Substanz mit einem Elutionspuffer wieder eluiert.

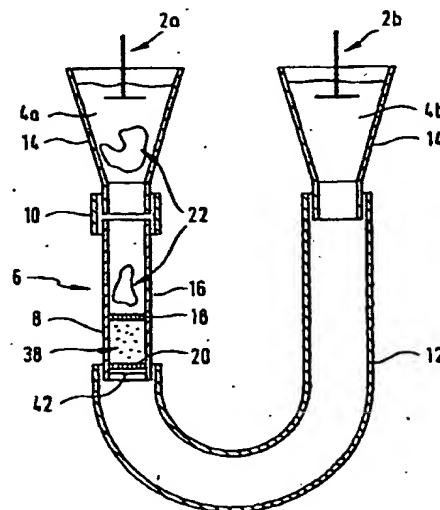


FIG. 1

DE 3913814 A 1

Beschreibung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur elektrischen Elution von auf Trenngelen gebundenen elektrisch geladenen Substanzen sowie eine Anordnung zur Durchführung dieses Verfahrens.

Die Auftrennung von Substanzen, insbesondere von biologischen Substanzen auf Trenngelen stellt eine weit verbreitete Methode dar, um unterschiedliche Moleküle zu trennen. Solche Trennverfahren werden sowohl zu analytischen als auch zu präparativen Zwecken durchgeführt. Bei der präparativen Anwendung ist jedoch die Rückgewinnung der aufgetrennten und auf dem Trenngel gebundenen Substanz äußerst problematisch, da insbesondere bei biologischen Substanzen die empfindlichen Moleküle beschädigt werden, was zu einem Verlust der Bioaktivität führt. Zur Lösung dieses Problems wurden bereits eine Reihe von Verfahren zur Rückgewinnung von auf Trenngel, insbesondere von auf Elektrophorese-Gelen gebundenen Substanzen beschrieben.

So ist es z. B. aus der Anwendungsvorschrift AN 120 von J. T. Baker (Groß Gerau) oder aus J.G. Guenther, Bio Techniques (Nov./Dec. 1984), 320–325 bekannt, Nukleinsäuren mittels Polyacrylamidgelen auf N,N'-Bis-acrylcystaminbasis (BAC) elektrophoretisch aufzutrennen und diejenigen Banden, welche die zu isolierenden Nukleinsäuren enthalten, aus dem Gel herauszuschneiden. Die herausgeschnittenen Gelstücke werden dann mittels β -Mercaptoethanol verflüssigt, wodurch die darin enthaltenen Nukleinsäuren aus der Gelmatrix freigesetzt werden und anschließend mit einer NATRIX-SPE-Säule (J. T. Baker, Groß-Gerau) isoliert werden können. Dieses Verfahren weist jedoch den Nachteil auf, daß die dabei zu verwendenden Trenngelsysteme nicht frei wählbar sind und es somit nicht bei allen biologischen Materialien anwendbar ist. Durch den Einsatz von Mercaptoethanol ist es besonders auf eine große Anzahl von Proteinen bzw. von Peptiden nicht anwendbar, da Mercaptoethanol Cysteinbrücken zerstört.

Es ist auch bekannt, Nukleinsäuren auf einer nieder schmelzenden Agarose aufzutrennen und diese nach erfolgter Auftrennung bei 70°C zu verflüssigen. Dabei wird die in der Agarosematrix festgehaltene Nukleinsäure freigesetzt und kann mittels einer Flüssigkeit extrahiert werden. In einem nachfolgenden Schritt werden dann die freigesetzten Nukleinsäuren aus der Flüssigkeit mittels einem Sorbens (Glass Milk, NATRIX) isoliert. Dieses Verfahren weist jedoch den Nachteil auf, daß die Agarose bei einer für biologisches Material relativ hohen Temperatur, nämlich bei 70°C zur Freisetzung der Nukleinsäuren aufgeschmolzen werden muß, welches regelmäßig zu einem beachtlichen Aktivitätsverlust führt. Außerdem kann eine doppelsträngige DNA schon bei Temperaturen ab 65°C in ihre Einzelstränge aufschmelzen. Desweiteren läßt sich auch bei diesem Verfahren das Trenngel-System nicht frei wählen und kann somit nicht an die aufzutrennende Substanz angepaßt werden. Desweiteren bleiben bei der Auftrennung häufig Agarosereste zurück, welche die nachfolgende Aufarbeitung stören (Ostermann L.A. (1984) "Methods of Protein and Nucleic Acid Research" Part 1, 86–89 und 136–149 (Springer, Berlin)).

In einem weiteren bekannten Verfahren wird das abgetrennte Agarosegelstück tiefgefroren und die darin enthaltene Nukleinsäure durch Pressen aus der tiefgefrorenen Gelmatrix herausgedrückt. Dieses Verfahren

weist neben den zuvor beschriebenen Problemen noch den Nachteil auf, daß es nicht in größerem Maßstab anwendbar ist, eine geringe Ausbeute ergibt und eine hohe Kontaminationsgefahr mit sich bringt.

Nach einem in Ostermann L.A. (1984) "Methods of Protein and Nucleic Acid Research" Part 1, 86–89 und 136–149 (Springer, Berlin) beschriebenen Verfahren wird bei der Auftrennung von Substanzgemischen in einer Elektrophorese-Apparatur die Stromzufuhr während der Elektrophorese unterbrochen und es wird unmittelbar vor der zu isolierenden Molekülbande eine Vertiefung in Form eines Troges in das Trenngel geschnitten und diese mit Puffer aufgefüllt. Anschließend wird erneut der Strom angestellt und durch die Elektrophoresespannung wandert die Molekülbande in die Vertiefung bzw. in den darin enthaltenen Puffer. Durch Entnehmen des Puffers können die sich darin befindlichen Moleküle isoliert werden. Es ist auch möglich, anstatt einer trogartigen Vertiefung einen Schlitz in das Gel zu schneiden und in diesen Schlitz einen Filter oder DEAE-Papierstreifen einzulegen. Dabei fängt das Papier die Nukleinsäuren während der weiteren Elektrophorese ab und diese können später mit einem geeigneten Puffer vom Papier abgelöst werden. Dieses Verfahren weist jedoch den Nachteil auf, daß es nur bei horizontalen Gelen anwendbar und umständlich zu handhaben ist. Darüberhinaus muß bei diesem Verfahren die Elutionszeit äußerst genau beachtet werden, da die Moleküle bei der Elektrophorese hinter der trogartigen Vertiefung wieder in das fortführende Elektrophoresegel einwandern. Vor allem hat dieses Verfahren jedoch den Nachteil, daß die zu isolierenden Moleküle während der Elektrophorese sichtbar gemacht werden müssen, um die zu isolierende Bande abzufangen. Dies geschieht üblicherweise entweder durch Anfärben, welches die zu isolierende Substanz chemisch modifiziert oder durch UV-Licht, welches eine Gefährdung des Experimentators und insbesondere bei Nukleinsäuren eine UV-Modifizierung der zu isolierenden Substanz hervorruft.

In Ostermann L.A. (1984) "Methods of Protein and Nucleic Acid Research" Part 1, 86–89 und 136–149 (Springer, Berlin) wurde auch schon versucht, die Gelstücke mit den entsprechenden Banden zu zerkleinern und diese in einem Elutionspuffer zu suspendieren, der gegebenenfalls mehrmals erneuert wird. Bei diesem Verfahren werden jedoch nur sehr verdünnte Lösungen der zu isolierenden Substanz erhalten, die sich insbesondere bei RNA und Proteinen nur mittels aufwendigen Verfahrensschritten wieder aufkonzentrieren lassen. Zudem treten beim Zerkleinern Scherkräfte auf, die hochempfindliche Biopolymere zerstören.

In J. Biochem. Biophys. Meth. 14, 245–260 (1987) Göbel et al. ist ein Verfahren beschrieben, wonach die zu isolierenden Moleküle in einem elektrischen Feld aus den Gelbruchstücken durch eine großporige Membran in eine einen Puffer enthaltende Kammer transportiert werden und von dort durch eine kleinporige Membran an dem Weiterwandern gehindert werden. Dieses System weist jedoch den Nachteil auf, daß es nur mit ganz bestimmten Membranen durchführbar ist und diese Membranen je nach Art des zu isolierenden Moleküls eine Verringerung der Ausbeute durch eine Membranadsorption hervorrufen. Nach diesem Verfahren ist es auch nicht möglich, kleinere Oligonukleotide oder kleinere Peptide zu isolieren, da diese ohne weiteres die hierbei verwendbaren Membranen durchdringen können.

Es ist schließlich auch versucht worden, Moleküle in

einer Zone hoher Salzkonzentration abzufangen (Neuhoff V. Ed. (1984) "Electrophoresis '84", 154–155 (Verlag Chemie, Weinheim)). Dabei wird so vorgegangen, daß man die Moleküle durch Anlegen eines elektrischen Feldes aus dem abgetrennten Gelstück herauswandern und danach in eine Zone von hoher Salzkonzentration wandern läßt. In dieser Zone wird die Wanderungsgeschwindigkeit der zu isolierenden Moleküle sehr stark verlangsamt, da die kleinen Ionen eine Salzfall ausbilden und annähernd den gesamten Ladungstransport übernehmen. Dieses Verfahren ist jedoch wegen der hohen Salzkonzentration für Proteine nicht gut geeignet. Darüberhinaus ist es bei der parallelen Isolierung verschiedener Gelbanden notwendig, daß die zu isolierenden Substanzen annähernd gleiche Molekulargewichte aufweisen. Auch ist es nicht möglich, diese Vorgehensweise auf größere Präparationen anzuwenden.

Der Erfindung liegt nun die Aufgabe zugrunde, die zuvor beschriebenen Nachteile zu überwinden und ein Verfahren zur elektrischen Elution von auf einem Trenngel aufgetrennten elektrisch geladenen Substanzen bereitzustellen, welches auf einfache Weise und mit hoher Ausbeute mit verschiedenen, insbesondere biologischen Substanzen, vorzugsweise mit Nukleinsäuren und Proteinen bzw. Peptiden anwendbar ist. Dabei sollen vorzugsweise Einmalartikel verwendbar sein, um eine Kreuzkontamination zu vermeiden und um das Arbeiten mit stark radioaktiven Proben zu erleichtern. Darüberhinaus soll ein Verfahren bereitgestellt werden, mit dem die aufzutrennenden Moleküle auch in einem größeren präparativen Maßstab isoliert werden können, wobei unabhängig von der späteren Elution das für die Auftrennung jeweils am besten geeignete Trenngel eingesetzt werden kann. Unter Trenngel ist dabei jegliches Material zu verstehen, das sich zur Auftrennung von Substanzgemischen eignet. Üblicherweise wird jedoch zum Auftrennen von elektrisch geladenen Teilchen Elektrophoresegel verwendet.

Diese Aufgabe wird gelöst durch ein Verfahren zur elektrischen Elution von elektrisch geladenen Substanzen von einem Trenngel. Das erfindungsgemäße Verfahren zeichnet sich nun dadurch aus, daß man zwischen den beiden Elektroden ein einen Elektro-Elutions-Puffer enthaltendes Aufnahmebehältnis und daran anschließend ein Sammelbehältnis anbringt, welches ein Sorbens für die zu eluierende Substanz enthält, wobei Aufnahme- und Sammelbehältnis so angeordnet werden, daß sie die einzige elektrisch leitende Verbindung zwischen den Elektroden darstellen. Bei der Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens wird nun derart vorgegangen, daß man das herausgetrennte Trenngel, welches vorzugsweise ein Elektrophoresegel ist, mit der zu eluierenden Substanz in das Aufnahmebehältnis bringt und durch Anlegen eines elektrischen Stromes ein elektrisches Feld erzeugt, in welchem die Substanz vom Trenngel in den Elektro-Elutionspuffer und anschließend in das Sammelbehältnis wandert. Durch das im Sammelbehältnis enthaltene Sorbens wird die Substanz gebunden und kann somit nicht mehr im angelegten elektrischen Feld weiterwandern. Nach Beendigung der Elektro-Elution wird nun die an das Sorbens gebundene Substanz mit einem Elutionspuffer wieder davon heruntereluiert. Zur Abkürzung des erfindungsgemäßen Verfahrens und zur Erhöhung der Ausbeute ist es zweckmäßig, nach dem Unterbrechen des elektrischen Stromes den Elektro-Elutions-Puffer durch das Sammelbehältnis laufen zu lassen, um auf diese Weise noch im Puffer enthaltene restliche Substanz an das Sorbens zu

binden. Ebenfalls als zweckmäßig hat es sich erwiesen, das Sorbens vor dem Heruntereluierten der zu isolierenden Substanz von nicht gebundenem Material mit einer Waschlösung freizuwaschen.

Die Erfindung betrifft jedoch auch eine Anordnung zur Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens. Die erfindungsgemäße Anordnung enthält Elektrodenräume für Kathode und Anode, wobei die Elektrodenräume nur über ein Behältnis zur Aufnahme des zu eluierenden Trenngels und über ein sich daran anschließendes Sammelbehältnis miteinander elektrisch leitend verbunden sind und wobei das Sammelbehältnis ein Sorbens enthält, in das die zu eluierende Substanz bindet. Erfindungsgemäß ist dabei das Sammelbehältnis auf derjenigen Seite des Aufnahmebehältnisses angebracht, zu der die zu isolierende elektrisch geladene Substanz im elektrischen Feld während der Elektro-Elution wandert.

In einer bevorzugten Ausführungsform ist das Sammelbehältnis gegenüber dem Aufnahmegefäß und/oder gegenüber dem Elektrodenraum mit einem lösungsmitteldurchlässigen Filter oder einer Fritte verschlossen. Zweckmäßigerweise bestehen die Fritten aus Glas, Porzellan oder einem gegenüber dem verwendeten Lösungsmittel und den darin gelösten Substanzen inerten Kunststoff, vorzugsweise aus Polyethylen.

Im erfindungsgemäßen Verfahren und für die dazugehörige Anordnung hat es sich als zweckmäßig erwiesen, als Sorbens Ionenaustauscher zu verwenden. Dabei richtet sich die Auswahl des verwendeten Ionenaustauschers nach der zu isolierenden Substanz sowie den pH-Werten der Elektro-Elutions- und der Elutions-Puffer. Als besonders geeignet haben sich Ionenaustauscher erwiesen, die quaternäres Methylamin auf porösem Glas gebunden enthalten, wie sie z.B. von der Firma J.T. Baker (Groß-Gerau, Bundesrepublik Deutschland) oder von der ICT Handelsgesellschaft mbH (Frankfurt) vertrieben werden. Auch Polyethylenimin oder DEAE-Gruppen enthaltende Trägermaterialien haben sich im erfindungsgemäßen Verfahren als gute Sorbenzien erwiesen. Als Trägermaterial wird dabei üblicherweise Silikagel oder Dextran verwendet. Die Porengröße des die Ionenaustauschergruppen enthaltenden Trägermaterials richtet sich ebenfalls nach der Art der zu isolierenden Substanz sowie nach dem Puffer und den pH-Werten. Üblicherweise beträgt die Porengröße des Trägermaterials 30 bis 1000 Å, vorzugsweise 50 bis 500 Å. Erfindungsgemäß finden jedoch auch Sorbenzien Verwendung, welche mit Reversed-Phase-Eigenschaften versehen sind. Hierbei sind solche Reversed-Phase-Materialien bevorzugt, deren Umkehrphase Kohlenwasserstoffketten von C_2 bis C_{22} , insbesondere von C_8 bis C_{18} enthält. Schließlich ist es auch möglich, im erfindungsgemäßen Verfahren Sorbenzien zu verwenden, die Affinitätsgruppen für die zu isolierende Substanz enthalten. Als Affinitäts-Liganden oder Effektoren finden insbesondere Antikörper, Enzyme, welche vorzugsweise inaktiviert sind sowie Hormone Verwendung. Die Herstellung solcher Affinitäts-Sorbenzien ist dem Fachmann bekannt und zusammenfassend in Chemie in uns. Zeit. 8 (1974), Seiten 17 bis 25 oder in Adv. Enzymol. 46 (1977) beschrieben.

Erfindungsgemäß können auch Sorbenzien aus Membranen als Trägermaterial verwendet werden, die mit den zuvor genannten Ionenaustauscher-, Reversed-Phase-, Affinitätsgruppen versehen sind.

Erfindungsgemäß hat es sich als äußerst zweckmäßig erwiesen, mittels Druck den Elektro-Elutions-Puffer

durch das Sorbens im Sammelbehältnis zu leiten. Üblicherweise wird dafür der Gasdruck verwendet, der dadurch entsteht, daß beim Anlegen eines Elutionsstromes eine Elektrolyse des Puffers stattfindet und sich dabei Gase entwickeln. Es hat sich nun gezeigt, daß es zweckmäßig ist, die Elektrolyse durch den dabei entstehenden Gasdruck zu regeln. Dieser entstehende Gasdruck bewirkt nämlich ein Absenken des Pufferspiegels im Elektrodenraum, der bei andauernder Elektrolyse sogar so weit sinken kann, daß die Elektrode den Kontakt mit dem Puffer verliert, wodurch der Stromfluß unterbrochen und die elektrische Elution gestoppt wird.

Das erfindungsgemäße Verfahren eignet sich im Besonderen zur Auftrennung von biologischen Substanzen wie den Nukleinsäuren DNA und RNA und von Proteinen. Es ist jedoch auch ohne weiteres möglich, auf diese Weise ganze Zell- oder Viruspartikel zu isolieren. Im erfindungsgemäßen Verfahren ist zwischen dem Elektro-Elutions-Puffer und dem Elutions-Puffer zu unterscheiden. Dabei wird unter Elektro-Elutions-Puffer derjenige Puffer verstanden, der im Aufnahmebehältnis bzw. in einem daran angeschlossenen Vorratsbehältnis enthalten ist und der als Ladungsträger bei der Elektro-Elution, d. h. bei der elektrisch bewirkten Elution der Substanz von dem Trenngel, verwendet wird. Demgegenüber wird unter der Bezeichnung Elutions-Puffer derjenige Puffer verstanden, der zum Ablösen und Auswaschen der gebundenen Substanzmoleküle aus dem Absorbens verwendet wird. Als Puffersubstanz wird im erfindungsgemäßen Verfahren vorzugsweise 3-Morpholino-propansulfonsäure (MOPS), Tris(Hydroxymethyl)-aminomethan (Tris), Tris-Borat (TB) oder auch Phosphatpuffer verwendet. Vorzugsweise wird dem Puffer ein Mittel wie Tetrabutylammoniumbromid (TBABr) zugesetzt, das die Bindung von Nukleinsäuren an Reversed-Phase-Oberflächen verbessert. Der günstigste pH der Pufferlösungen richtet sich nach der jeweils zu isolierenden Substanz und kann vom Fachmann durch einfache Versuche bestimmt werden. Üblicherweise beträgt er 5 bis 9 und vorzugsweise 5 bis 8,5. Besonders bevorzugt ist ein pH-Bereich zwischen 6 und 8. Wird als Sorbensmaterial ein Ionenaustauscher oder ein Affinitäts-Sorbens verwendet, so enthält der Elutionspuffer vorzugsweise zusätzlich Harnstoff und ein Salz. Als Salz wird dabei zweckmäßigerweise Natriumchlorid und zwar vorzugsweise in einer Konzentration von 1,5 M oder größer verwendet. Wird als Sorbens ein Reversed-Phase-Material eingesetzt, so finden üblicherweise Elutionspuffer Verwendung, welche ein polares organisches Lösungsmittel in wäßriger Lösung enthalten. Als polare organische Lösungsmittel werden vorzugsweise niedere Alkohole, insbesondere C₁ - C₄-Alkohole oder auch Acetonitril verwendet. Von den Alkoholen sind wiederum Ethanol, Isopropanol und Isobutanol bevorzugt.

Die im Elutionspuffer enthaltene isolierte Substanz kann nun in Reinform durch Gefriertrocknen, gegebenenfalls nach vorheriger Dialyse, oder durch Ausfällen mittels einem Alkohol oder Ammoniumsulfat in konzentrierter Form gewonnen werden.

Die im erfindungsgemäßen Verfahren bei der elektrischen Elution verwendeten Stromstärken und Spannungen betragen üblicherweise 60 bis 200 Volt, vorzugsweise 80 bis 180 und insbesondere 120 bis 150 Volt. Die angewendete Stromstärke richtet sich im erfindungsgemäßen Verfahren nach dem kleinsten Durchmesser der Anordnung, den üblicherweise die Auslauffläche des Sammelbehältnisses aufweist. Dabei ist die spezifische

Stromstärke, bezogen auf den kleinsten Durchmesser der Anordnung, zweckmäßigerweise kleiner als 60 mA/cm² und liegt vorzugsweise unter 20 mA/cm². Besonders bevorzugt sind Stromstärken von etwa 10 mA/cm².

Bei der erfindungsgemäßen Vorrichtung weist das Sorbens üblicherweise den größten spezifischen elektrischen Widerstand auf. Dies führt dazu, daß sich gerade dieser Teil der Apparatur stärker erwärmt als andere Bereiche. Daher ist es zweckmäßig, eine maximale Stromstärke zu verwenden, bei welcher sich das Sorbens nicht zu sehr erwärmt.

In einer bevorzugten Ausführungsform wird daher der Elektro-Elutions-Puffer langsam durch das Sorbens geleitet, wodurch es diesem die entstandene Wärme wieder entzieht. Dabei werden das Sorbens und die sich darin befindenden Substanzen abgekühlt. Bei besonders empfindlichen Substanzen oder zur Schonung des Sorbens hat es sich als zweckmäßig erwiesen, den Elektro-Elutions-Puffer zusätzlich zu kühlen. In diesem Fall ist es auch möglich, das erfindungsgemäße Verfahren mit größeren Stromstärken durchzuführen. Vorzugsweise wird der Elektro-Elutions-Puffer mit solch einer Geschwindigkeit durch das Sorbens geleitet, daß die darin befindliche Puffermenge alle 5 Minuten, insbesondere alle 2 Minuten einmal ausgetauscht wird. Die Erfindung wird anhand der in den Fig. 1 bis 6 dargestellten bevorzugten Ausführungsformen näher erläutert.

Fig. 1 zeigt eine einfache Vorrichtung zur elektrischen Elution, die aus üblichen Laborartikeln zusammengesetzt ist.

Fig. 2 zeigt eine Vorrichtung zur Elektroelution im Parallelbetrieb und für verschiedene Säulengrößen.

Fig. 3 zeigt einen Adapter zum Anpassen verschiedener Säulengrößen beim Parallelbetrieb.

Fig. 4 zeigt eine einzelne Säule, bestehend aus Sammelbehältnis und Aufnahmebehältnis und

Fig. 5 zeigt einen Elektrodenraum zum Aufstecken auf die Trennsäule von Fig. 4, wobei der Elektrodenraum zusätzlich als Vorratsgefäß für den Elektro-Elutions-Puffer dient.

Fig. 6 zeigt eine bevorzugte erfindungsgemäße Vorrichtung, bei welcher das entstehende Gasvolumen verwendet wird, um den Elektro-Elutions-Puffer durch das Sorbens zu drücken.

In der Fig. 1 ist eine Ausführungsform der erfindungsgemäßen Vorrichtung gezeigt, die sich aus einfachen Labormaterialien zusammensetzen läßt. In dieser Ausführungsform befinden sich die Elektroden 2a, 2b in den Elektrodenräumen 4a, 4b, die gleichzeitig als Vorratsgefäß für den Elektroelutionspuffer dienen. Die Elektroden 2a, 2b sind über das Aufnahmebehältnis 6 und das Sammelbehältnis 8 elektrisch leitend miteinander verbunden. Dabei bestehen die Elektrodenräume 4a, 4b aus Trichtern 14, welche mit Silikonschläuchen 10, 12 mit dem Aufnahmebehältnis 6 und dem Sammelbehältnis 8 verbunden sind. Aufnahmebehältnis 6 und Sammelbehältnis 8 werden dabei von einer Säule 16 gebildet, wobei das Sammelbehältnis 8 durch Polyethylenfritten 18, 20 begrenzt ist und ein Sorbens 38 enthält. Die Polyethylenfritten 18, 20 weisen Poren von 20 µm Durchmesser auf. Das die zu isolierende Substanz enthaltende Trenngel 22 ist im Vorratsbehältnis 6 enthalten.

Eine für den Parallelbetrieb geeignete Ausführungsform der erfindungsgemäßen Vorrichtung ist in den Fig. 2 bis 5 dargestellt. Diese Ausführungsform besteht aus einem L-förmigen Elektrodenkasten 24 der den einen Elektrodenraum 4b darstellt und der einen am unteren Ende des Kastens angebrachten, rechtwinklig abste-

henden Vorsatz 26 aufweist und der Bohrungen 28 zur Aufnahme der Adapter 30 aufweist. In dem Adapter 30 sitzen die Säulen 16 mit dem aufgesteckten Trichter 32, der den anderen Elektrodenraum 4a darstellt. Der in Fig. 3 dargestellte Adapter 30 ist derart ausgebildet, daß er mit seinem äußeren Durchmesser exakt in die Bohrungen 28, die ggf. ein Gewinde aufweisen, des Vorsatzes 26 des Elektrodenkastens 24 von Fig. 2 paßt. Der Adapter 30 hat eine innere Aufbohrung 34, in welche sich die Säule 16 lösungsmitteldicht aufstecken oder auch aufschrauben läßt. Zur besseren Abdichtung weist der Adapter 30 außen und innen lösungsmittelfeste O-Ringe 36 auf.

Bei der in Fig. 4 dargestellten Säule 16 ist das Sammelbehältnis 8 vom Aufnahmebehältnis 6 durch zwei Polyethylenfritten 18, 20 abgetrennt. Es enthält ein Sorbens 38.

Fig. 5 zeigt einen Trichter 32, der lösungsmitteldicht auf die Säule 16 aufgesteckt wird und der die Elektrode 2a enthält. Zum Schutz des Aufnahmebehältnisses weist der Trichter 32 einen Filter oder ein Sieb 40 auf. Die Erfindung wird anhand der folgenden Beispiele näher erläutert.

Schließlich zeigt Fig. 6 eine erfindungsgemäße Vorrichtung, bei der die elektrolytische Gasbildung dazu benutzt wird, den Elektro-Elutions-Puffer durch das Sorbens zu pressen. Die erfindungsgemäße Vorrichtung weist einen gasdicht auf dem Elektrodenraum 4a aufsitzen- den Deckel auf, wodurch das bei der Elektrolyse gebildete Gas 46 nicht mehr in die umgebende Atmosphäre entweichen kann und somit ein Überdruck im Elektrodenraum 4a entsteht, der bewirkt, daß der Elektro-Elutions-Puffer langsam durch das Sammelbehältnis 8 mit dem Sorbens 38 gedrückt wird. Auf diese Weise wird der Level oder Spiegel der Pufferoberfläche 48 langsam abgesenkt. Entsteht so viel Gas 46, daß der Pufferspiegel 48 unter die Elektrode 2a absinkt, so wird der Stromfluß und damit auch die elektrische Elution gestoppt. Auf diese Weise ist es möglich, durch ein mehr oder weniger tiefes Eintauchen der Elektrode 2a in den Elektro-Elutions-Puffer bei gleichzeitiger Wahl einer bestimmten Stromstärke die Elutionsdauer vorher festzulegen. Das Durchleiten des Elektro-Elutions-Puffers durch das Sammelbehältnis 8 mit dem Sorbens 38 während der Elektrolyse, wie dies mit der in Fig. 6 dargestellten Vorrichtung möglich ist, hat den Vorteil, daß lokal auftretende pH-Änderungen im Sorbens, wie sie bei der Bindung geladener Moleküle an Ionenaustauscher auftreten, reduziert werden, was wiederum je nach Art des Ionenaustauschers zu einer Erhöhung der Bindungskapazität führen kann. Darüberhinaus führt das Durchleiten des Puffers zu einer Kühlung des Sorbens, welches sich, da es den größten spezifischen elektrischen Widerstand hat, in der erfindungsgemäßen Vorrichtung üblicherweise am stärksten erwärmt. Die hierbei auftretende Kühlung ermöglicht die Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens auch mit größeren Stromstärken. Schließlich ermöglicht der Verschluss eines Elektrodenraumes auch Anordnungen, bei denen die Pufferstände der beiden Elektrodenräume innerhalb weiter Grenzen variiert werden können. Zudem gelangen auch die geladenen Moleküle nach dem Austritt aus dem zu eluierenden Gel durch den Fluß des Puffers schneller in das Sorbens 38.

Beispiel 1

Mittels der in Fig. 2 dargestellten erfindungsgemäßen

Vorrichtung wurden Versuche zur Elektro-Elution von RNA durchgeführt. Dabei wurden Gemische aus doppelsträngiger und einzelsträngiger RNA mit 220 bis 80 Basen bzw. Basenpaaren auf einem Elektrophoresegel aufgetrennt, die jeweiligen Banden aus dem Elektrophoresegel herausgeschnitten und mit dem erfindungsgemäßen Verfahren elektrisch eluiert. Dabei wurde pro Säule jeweils 100 mg Absorbens verwendet. Das Volumen der Säule betrug 1,5 ml und der Durchmesser des Auslaufes 5 mm. Die Stromstärke während der Elektro-Elution betrug 2 mA pro Säule, welches einem spezifischen Stromfluß von 10 mA/cm² pro Auslauffläche entspricht. Vor der Elution wurden alle Säulen mit 5 ml Elektroelutionspuffer equilibriert. Die verwendete RNA wurde mit 3H-GMP markiert und die Konzentrationen mit einem Szintillationszähler (Packard TriCarb CA1900) bestimmt. Als Sorbens wurden im einzelnen die folgenden Materialien verwendet:

- QMA: SEP-PAK, quaternäres Methylamin auf porösem Glas mit einer Porengröße von 500 Å (SEP-PAK Accell QMA, Waters Millipore GmbH, Eschborn).
- SAX: quaternäres Methylamin, gebunden auf einem porösen Glas mit einer Porengröße von 60 Å (BOND ELUT SAX, ICT Handelsgesellschaft mbH, Frankfurt).
- N+: quaternäres Methylamin ebenfalls auf porösem Glas (Baker SPE Trennsäule N+, J. T. Baker, Groß-Gerau).
- PEI: Polyethylenimin auf einem weitporigen Silikagel mit einer Porengröße von 275 Å aufgebracht (Baker SPE Trennsäule WP PEI, J. T. Baker, Groß-Gerau).
- Quiagen: ein Anionenaustauscher auf Silikagel, wie er von der Firma Diagen, Düsseldorf, vertrieben wird.
- NATRIX: eine Silikamatrix mit Reversed-Phase-Eigenschaften (J. T. Baker, Groß-Gerau).
- C2: eine mit einer C2-Kohlenstoffkette beladene Reversed-Phase-Matrix (BOND ELUT C2, ICT Handelsgesellschaft mbH, Frankfurt).
- C18: ein mit einer C18-Kohlenwasserstoffkette beladenes Reversed-Phase-Material (SEP-PAK C18, Waters Millipore GmbH, Eschborn).

Zur Bestimmung der Ausbeute wurde die Radioaktivität der eingesetzten RNA-Menge vor und nach der Elektro-Elution gemessen. Die in einem Elektrophoresegel aufgetrennte RNA wurde in der erfindungsgemäßen Vorrichtung mit einem Elektro-Elutions-Puffer, bestehend aus 50 mM MOPS-Na mit einem pH von 7,0 vom Elektrophoresegel über einen Zeitraum von 15 bis 60 min eluiert. Anschließend läßt man den sich noch im Aufnahmebehältnis befindenden Elektro-Elutions-Puffer durch das Sorbens laufen und spült mit 3 x 1 ml destilliertem Wasser nach. Anschließend wird die auf dem Sorbens festgehaltene RNA mit einem Elutionspuffer, bestehend aus 50 mM MOPS · Na, pH 7,5, 2 M Harnstoff, 1 M NaCl und 15% (V/V) Ethanol in Wasser abgewaschen. Die Ausbeute betrug dabei je nach verwendetem Sorbens bei QUIAGEN 98%, bei QMA 67%, bei N+ 84% und bei SAX 78%.

Beispiel 2

Beispiel 1 wurde unter Verwendung eines Reversed-Phase-Sorbens wiederholt. Dabei wurde als Elektro-Elutions-Puffer eine wäßrige Lösung mit 50 mM MOPS · Na, pH 7,0 und 2,5 mM TBABr und als Elutionspuffer Acetonitril/Wasser 1:1 (V/V) verwendet. Dabei wurden folgende Ausbeuten erhalten: C2 – 36%;

C 18 = 16% und NATRIX = 98%.

Beispiel 3

Es wurde Beispiel 1 unter Verwendung von Polyethylenimin als Sorbens wiederholt. Als Elektro-Elutions-Puffer wurde dabei 50 mM Tris-Borat (TB) mit einem pH von 8,3 und als Elutionspuffer 50 mM TB, pH 8,3 mit 2 M Harnstoff und 1 M NaCl in 15% (V/V) Ethanol verwendet. Die Ausbeute betrug dabei 100%.

Beispiel 4

Beispiel 1 wurde mit 50 mM TB, pH 8,3 und 2,5 mM TBABr als Elektro-Elutions-Puffer und mit 50 mM TB, pH 8,3, 2 M Harnstoff, 1 M NaCl in 15%iger Ethanol (V/V) wiederholt. Dabei betrug die Ausbeute je nach verwendetem Sorbens bei QUIAGEN 98%, bei QMA 62%, bei SAX 77% und bei PEI 52%.

Beispiel 5

Beispiel 1 wurde mit einem Elektro-Elutions-Puffer wiederholt, der 50 mM TB, pH 8,3, 2,5 mM TBABr enthält und mit einem Elutionspuffer aus Acetonitril/Wasser 1 : 1 (V/V) wiederholt. Bei der Verwendung von C18 als Sorbens betrug die Ausbeute 51% und bei NATRIX 98%.

Beispiel 6

Wie im Beispiel 1 beschrieben, wurde das erfindungsgemäße Verfahren mit einer doppelsträngig linearisierten (mit ApaI) 2964 Basenpaaren enthaltenden Plasmid-DNA (Plasmid BlueKS+, Stratagene) durchgeführt. Mit 50 mM TB, pH 8,3 und 2,5 mM TBABr als Elutionspuffer und mit 1,5 M NaCl, 50 mM MOPS, pH 7,5 in 50% (V/V) Ethanol wurde mit QUIAGEN als Sorbens eine Ausbeute von 72% und mit PEI eine Ausbeute von 18% erhalten.

Beispiel 7

Die Wiederholung von Beispiel 6 mit einem Reverse-Phase-Sorbens und einem Elektro-Elutions-Puffer, der 50 mM TB, pH 8,3 und 2,5 mM TBABr enthält und Acetonitril/Wasser 1 : 1 (V/V) als Elutionspuffer ergibt mit NATRIX eine Ausbeute von 48% und mit C18 von 42%.

Beispiel 8

Das 5793 Basenpaare große doppelsträngige Plasmid pQ β l wird mit BamHI und DraI enzymatisch geschnitten. Auf diese Weise wird ein Gemisch von DNA-Restriktionsfragmenten mit 1869, 1171, 1030, 692, 527, 532, 53 und 19 Basenpaaren erhalten. Dieses Gemisch wird elektrophoretisch aufgetrennt und die einzelnen Banden, wie im Beispiel 1 beschrieben, elektrisch eluiert.

- Unter Verwendung der Pufferlösung von Beispiel 6 wird dabei mit QUIAGEN als Sorbens eine Ausbeute von 100% und mit PEI von 29% erhalten.
- Unter Verwendung der Elutionspuffer von Beispiel 7 wird mit NATRIX als Sorbens eine Ausbeute von 53% und mit C18 von 36% erhalten.

Beispiel 9

Handelsübliches Rinderserumalbumin wird in Wasser gelöst und die Konzentration durch die Absorption bei 280 nm in einem Perkin-Elmer lambda 17 Spektrometer bestimmt. Das Rinderserumalbumin wird auf ein Elektrophoresegel aufgetragen und nach erfolgter Elektrophorese die Bande vom Gel ausgeschnitten und elektrisch eluiert.

- Bei der Verwendung von 50 mM Tris · C1, pH 7,5 als Elektroelutionspuffer und von 50 mM Tris × C1, pH 7,5 und 1 mM NaCl als Elutionspuffer wird dabei mit QMA als Sorbens eine Ausbeute von 75% und mit PEI von 44% erhalten.
- Wird als Sorbens ein Reversed-Phase-Material und 50 mM Tris · C1, pH 7,5 als Elektro-Elutions-Puffer und Acetonitril/Wasser 1 : 1 (V/V) als Elutionspuffer verwendet, so beträgt die Ausbeute bei C18 als Sorbens 100%.

Patentansprüche

- Anordnung zur elektrischen Elution von auf Trenngelen (22) gebundenen, elektrisch geladenen Substanzen, umfassend mindestens jeweils einen Elektrodenraum (4a, 4b) für Kathode und Anode, dadurch gekennzeichnet, daß die Elektrodenräume (4a, 4b) als einzige elektrisch leitende Verbindung über ein Aufnahme-Behältnis (6) für das zu eluierende Trenngel (22) und über ein sich daran anschließendes Sammelbehältnis (8) miteinander verbunden sind und wobei das Sammelbehältnis (8) ein Sorbens (38) enthält, an das die zu eluierende Substanz bindet.
- Anordnung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß sie als Sorbens (38) einen Ionenaustauscher enthält.
- Anordnung nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß das Sorbens (38) DEAE-Gruppen enthält.
- Anordnung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß es als Sorbens (38) ein Reversed Phase-Material enthält.
- Anordnung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß das Sammelbehältnis (8) vom Aufnahmebehältnis (6) und/oder vom Elektrodenraum durch Filter und/oder Fritten (18, 20) abgetrennt ist.
- Anordnung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß der an das Aufnahmebehältnis 6 angrenzende Elektrodenraum (4a) gasdicht verschlossen ist und der andere Elektrodenraum (4b) Gausaustrittsöffnungen aufweist.
- Anordnung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Elektrodenräume (4a, 4b) über mehrere parallel geschaltete Aufnahme- (6) und Sammelbehältnisse (8) elektrisch leitend miteinander verbunden sind.
- Verfahren zur elektrischen Elution von elektrisch geladenen Substanzen von einem Trenngel (22), dadurch gekennzeichnet, daß man
 - das die Substanz enthaltende Trenngel (22) in ein zwischen zwei Elektroden (2a, 2b) angebrachtes, einen Elektro-Elutions-Puffer enthaltendes Aufnahmebehältnis (6) bringt, und
 - durch Anlegen eines elektrischen Feldes die

Substanz von dem Trenngel (22) heraus in den Elektro-Elutions-Puffer und von dort

– in ein Sammelbehältnis (8) wandern läßt, welches ein Sorbens (38) enthält,

– die Substanz an das Sorbens (38) bindet und anschließend

– die vom Sorbens (38) gebundene Substanz mit einem Elutionspuffer wieder eluiert.

9. Verfahren nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß man vor der Elution der gebundenen Substanz mit dem Elutionspuffer das Sorbens (38) mit einem Waschpuffer von nicht gebundenem Material freiwäscht.

10. Verfahren nach einem der Ansprüche 8 bis 9, dadurch gekennzeichnet, daß man den Elektro-Elutions-Puffer zumindest teilweise mittels Druck durch das Sorbens leitet.

11. Verfahren nach einem der Ansprüche 8 bis 10, dadurch gekennzeichnet, daß man den bei der elektrischen Elution durch Elektrolyse entstehenden Gasdruck verwendet, um den Elektro-Elutions-Puffer zumindest teilweise durch das Sorbens (38) zu leiten.

12. Verfahren nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, daß die elektrische Elution durch Erzeugung einer bestimmten Gasmenge im Elektrodenraum (4a) den Pufferspiegel so weit senkt, daß dieser den Kontakt mit der Elektrode (2a) verliert und auf diese Weise die elektrische Elution gestoppt wird.

13. Verfahren nach Anspruch 8 oder 9, dadurch gekennzeichnet, daß man vor der Elution der Substanz vom Sorbens (38) den gesamten Elektro-Elutions-Puffer durch das Sorbens (38) leitet.

14. Verfahren nach einem der Ansprüche 8 bis 13, dadurch gekennzeichnet, daß man das Sorbens (38) mittels Durchleiten des Elektro-Elutions-Puffers durch das Sammelbehältnis (8) kühlt.

15. Verfahren nach einem der Ansprüche 8 bis 14, dadurch gekennzeichnet, daß man als elektrisch geladene Substanz biologische Moleküle verwendet.

16. Verfahren nach einem der Ansprüche 8 bis 15, dadurch gekennzeichnet, daß man als elektrisch geladene Substanzen DNA, RNA, Proteine oder Peptide verwendet.

17. Verfahren nach einem der Ansprüche 8 bis 16, dadurch gekennzeichnet, daß man einen Elektro-Elutions-Puffer mit einem pH von 5 bis 9 verwendet.

18. Verfahren nach einem der Ansprüche 8 bis 17, dadurch gekennzeichnet, daß man einen Elektro-Elutions-Puffer mit einem pH von 6 bis 8,0 verwendet.

19. Verfahren nach einem der Ansprüche 8 bis 18, dadurch gekennzeichnet, daß man als Elutionspuffer MOPS und/oder Tris-Borat verwendet.

20. Verfahren nach einem der Ansprüche 8 bis 19, dadurch gekennzeichnet, daß man einen Elutionspuffer verwendet, der Harnstoff enthält.

21. Verfahren nach einem der Ansprüche 8 bis 20, dadurch gekennzeichnet, daß man einen Elutionspuffer verwendet, der NaCl enthält.

22. Verfahren nach einem der Ansprüche 8 bis 21, dadurch gekennzeichnet, daß man das Verfahren mit einer Stromstärke von höchstens 50 mA/cm², bezogen auf die Auslauffläche (42) des Sammelbehältnisses (8), durchführt.

23. Verfahren nach einem der Ansprüche 8 bis 22,

dadurch gekennzeichnet, daß die Stromstärke höchstens 10 mA/cm², bezogen auf die Auslauffläche (42) des Sammelbehältnisses (8) beträgt.

24. Verfahren nach einem der Ansprüche 8 bis 23, dadurch gekennzeichnet, daß als Trenngel ein Elektrophoresegel verwendet wird.

Hierzu 3 Seite(n) Zeichnungen

Nummer:
Int. Cl.⁸:
Offenlegungstag:

DE 39 13 814 A1
B 01 D 87/02
19. Juli 1990

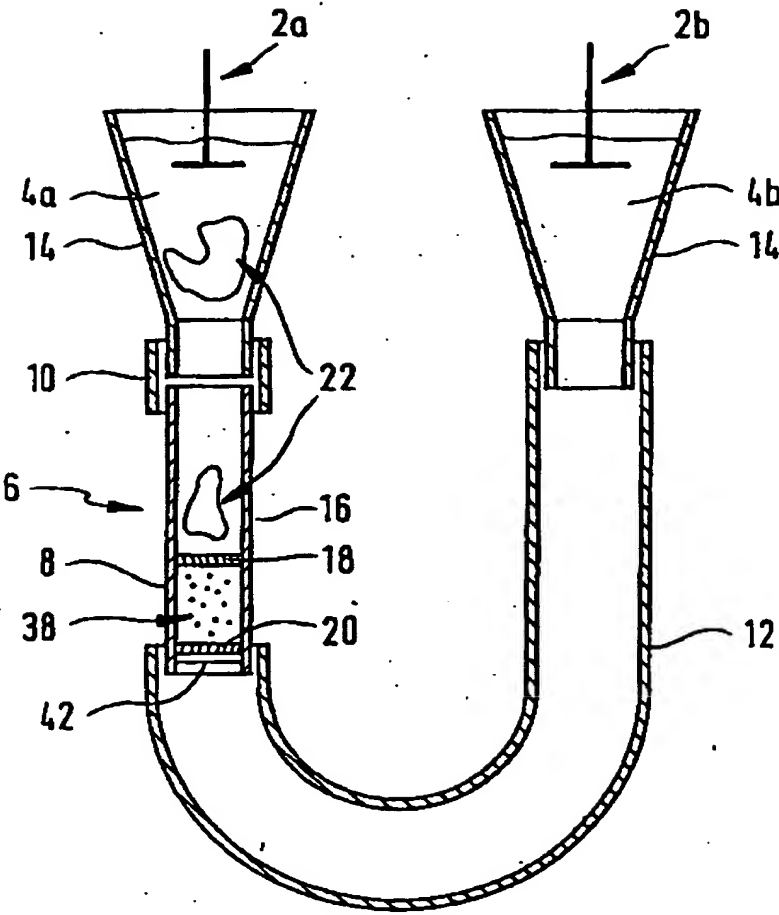


FIG. 1

Nummer:
Int. Cl. 5:
Offenlegungstag:

DE 39 13 814 A1
B 01 D 57/02
19. Juli 1990

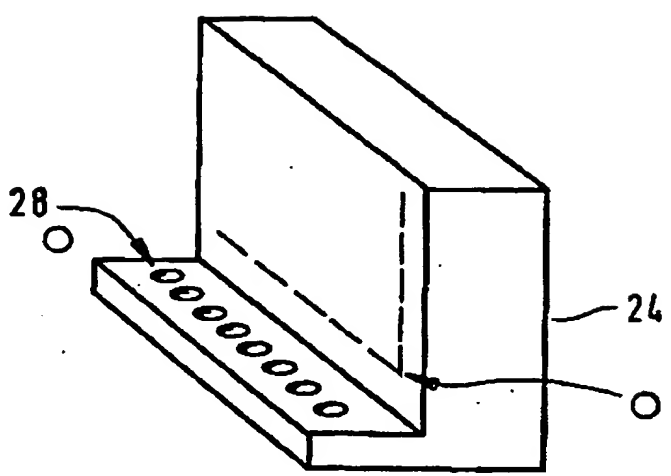


FIG. 2

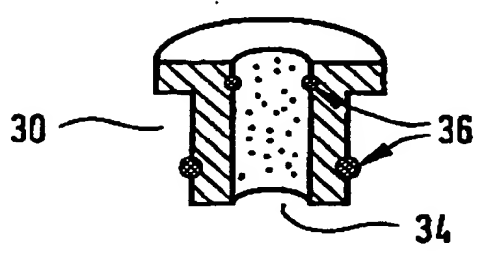


FIG. 3

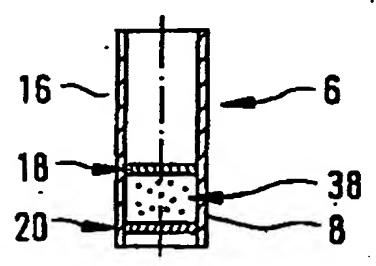


FIG. 4

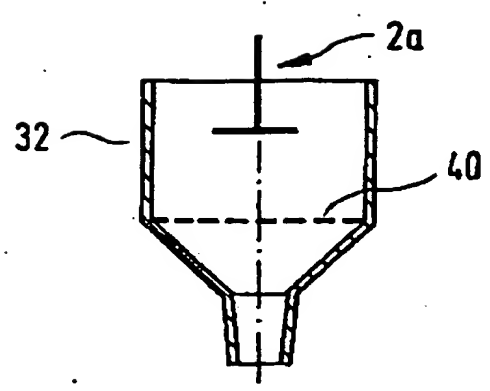


FIG. 5

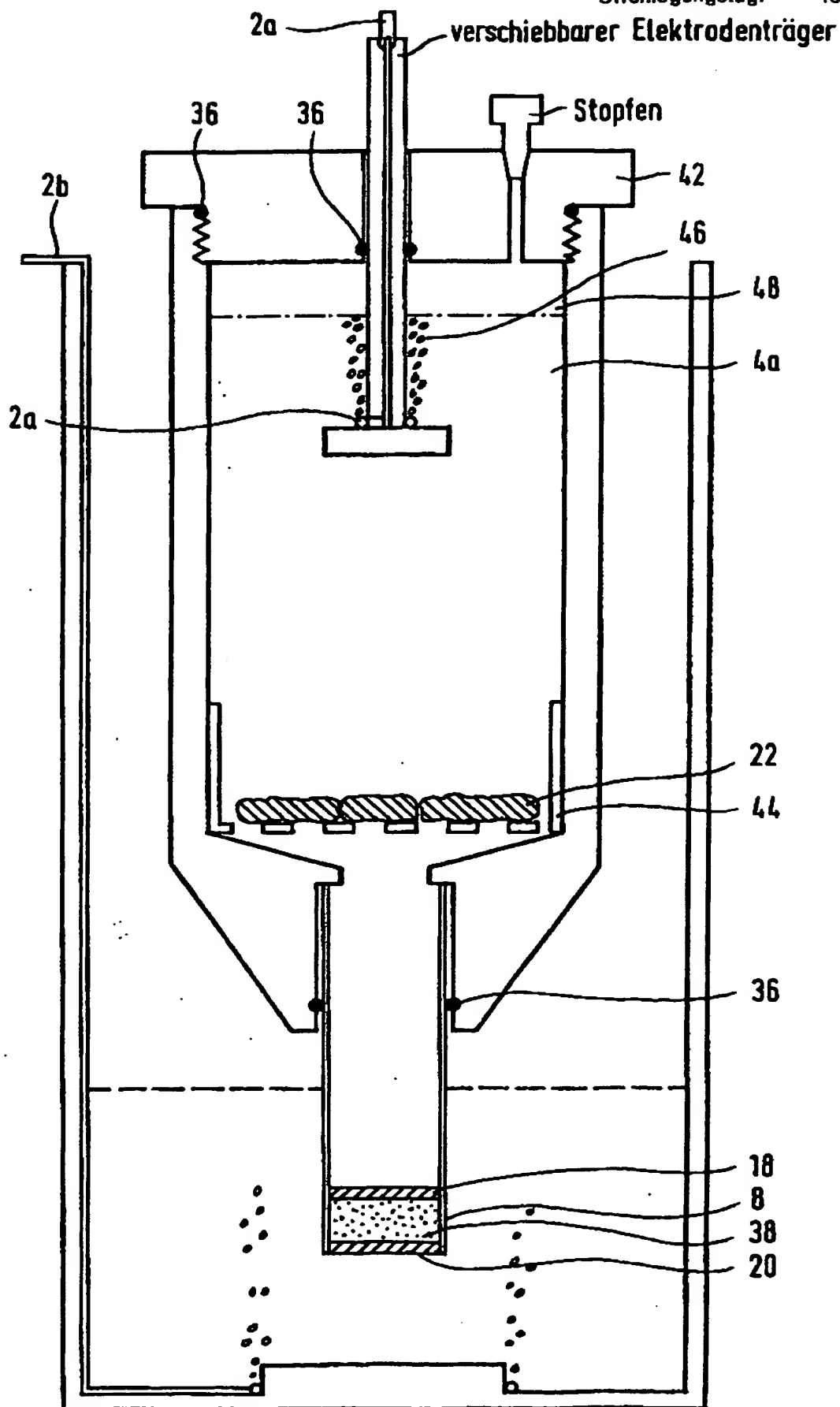


FIG.6